



## Набор ИФА для полуколичественного и качественного определения в сыворотке и плазме антител класса IgM к цитомегаловирусу (ЦМВ)

Каталог. № : CMV3055M

Количество : 96

Производитель: Origenium Laboratories (Финляндия)

Методика от 24-09-2009

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор компании «Орджениум Лабораториз» **Cytomegalovirus (CMV) IgM Antibody EIA Test** разработан для **полуколичественного и качественного** определения специфических антител класса IgM в сыворотке и плазме к цитомегаловирусу (ЦМВ).

**Настоящий анализ предназначен только для диагностического использования in vitro.**

Окончательный диагноз должен быть поставлен квалифицированным врачом в контексте клинической истории пациента в сочетании с другими подтверждающими диагностическими методами при их применении.

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящее исследование основано на принципе иммуноферментных анализов (ИФА). Очищенный антиген наносится на поверхность лунок микротитрационного планшета. Разбавленные образцы и контроли капают из пипетки в лунки микротитрационного планшета. Происходит закрепление между антителами класса IgM сыворотки или плазмы и иммобилизированным антигеном. После 30-минутной инкубации при 37°C планшет промывается разбавленным промывочным раствором, чтобы удалить несвязанный материал. Впоследствии, конъюгат пероксидазы анти-человеческого IgM добавляется и инкубируется в течение 30 минут при 37°C. После дальнейшей промывки раствора (ТМБ) субстрата капается из пипетки и инкубируется в течение 15 минут при 37°C, стимулируя развитие синего цвета в лунках. Развитие цвета прекращается добавлением стоп-раствора, который изменяет цвет от синего до желтого. Получившийся окрас измеряется спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Общее время инкубации: **75 минут**.

### КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

- Микролуночный планшет**, 1 шт. : 12x8 лунок  
Микротитрационные стрипы, помеченные определенным цветом и кодом, каждая состоящая из 8 лунок, покрытых очищенным антигеном ЦМВ. Цветовые и текстовые коды указывают исследуемый на стрипе патоген.
- Отрицательный контроль**, 1 флакон  
Готовый к использованию.
- Положительный контроль**, 1 флакон  
Готовый к использованию.
- Ферментный конъюгат\*\***, 15 мл  
Антитела к человеческому IgM, конъюгированные с пероксидазой хрена, синего цвета. Готовый к использованию.
- Раствор субстрата ТМБ**, 8 мл  
Содержит раствор 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Готовый к использованию; потенциально опасен при контакте с кожей; раздражает глаза.
- Стоп-раствор ТМБ**, 8 мл  
Содержит раствор 2 N серной кислоты (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
Готовый к использованию; избегать контакта со стоп-раствором; он может вызвать раздражения кожи и ожоги.
- Разбавитель образцов\*\*\***, 120 мл  
Готовый к использованию.
- Промывочный буфер – концентрат**, 50 мл 20x концентрированный.
- Крышка планшета**, 1 шт.

Крышка для накрывания микротитрационных стрипов во время инкубации.

### СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Все компоненты набора, кроме 20x концентрированного промывочного буфера, должны храниться при 2-8°C и использоваться до даты истечения срока годности, указанного на этикетке. Хранить 20x концентрированный промывочный буфер при комнатной температуре.
- В случае образования кристаллов в буфере, просто следует нагревать реактивную бутылку до 37°C, пока кристаллы полностью не растворятся.
- Неиспользованные стрипы должны быть помещены в мешочек, содержащий осушитель и плотно закрыты перед хранением при 2-8°C. После вскрытия стрипы стабильны пока осушитель не станет розовым.
- Разбавленный промывочный раствор может храниться в течение 1 недели при комнатной температуре или 1 месяц при 2-8°C.
- Готовый к использованию фермент, конъюгированный анти-человеческими антителами, сразу после вскрытия стабилен до окончания срока годности на этикетке. Предотвращать от загрязнения. Не возвращать неиспользованную часть конъюгированного ферментом раствор анти-человеческого IgM обратно в бутылку с исходным раствором.
- Все другие жидкие реагенты стабильны если хранить при 2-8°C, при условии, что с ними обращаются внимательно во избежание любого загрязнения окружающей среды. Прежде, чем их выбросить или обработать в автоклаве, они должны рассматриваться как потенциально инфекционные.

### ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Должны использоваться образцы сыворотки или плазмы (ЭДТА, гепарин); соблюдать обычные предосторожности при венопункции. Образец может храниться при 2-8°C до 48 часов, но должен быть заморожен до -20°C или ниже в течение более длительного хранения.
- Необходимо избегать повторного замораживания/размораживания.
- Размороженные образцы должны быть перевернуты несколько раз перед исследованием.
- Не использовать чрезвычайно гемолизированные или липемические образцы.

### ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ МАТЕРИАЛЫ:

- Таймер
- Вихревой смеситель (вортекс)
- Пробирки для разбавления образцов на 2 или 4 мл
- Дозаторы (3, 20, 50, 100, 500 мкл и 1 мл) и многоканальный дозатор (400 мкл)
- Одноразовые наконечники
- Инкубатор, способный к поддержанию 37±2°C
- Дистиллированная вода
- Мерные колбы для подготовки промывочного раствора
- Магнитная мешалка и дополнительная стойка для подготовки промывочного буфера
- Резервуары реагентов для многоканальных дозаторов
- Бумажные полотенца или промокательная бумага
- Микротитрационный ИФА-ридер, способный измерять абсорбцию при 450 нм.
- Микротитрационный планшет-вошер (выборочно).

### ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

Всем реагентам, образцам и контролям нужно позволить достичь комнатной температуры перед использованием.

#### 1. Образцы сыворотки и плазмы

**Перемешать вихревым смесителем и разбавить** образцы сыворотки 1:101 готовым к использованию разбавителем сыворотки (например, 10 мкл образца + 1 мл разбавителя образца).

**10 мкл сыворотки + 1 мл разбавителя образца**

#### 2. Промывочный буфер

**Хорошо перемешать и разбавить** концентрат промывочного буфера дистиллированной водой 1:20 (например, 50 мл концентрата + 950 мл дистиллированной воды). Если во время хранения в холодном месте образуется осадок кристаллов, концентрат нужно нагревать до 37°C в течение 15 минут. Проверить pH разбавленного

промывочного буфера и если необходимо сбалансировать его pH на уровне 7.4. Промывочный буфер стабилен 1 месяц при 2-8°C или в течение 1 недели при комнатной температуре.

**50 мл концентрата промывочного буфера + 950 мл дист. воды**

**ВАЖНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ**

- По крайней мере за 1 час до использования привести все реагенты, набор калибраторов и образцы к комнатной температуре (18-30°C), тщательно их перемешивая вихревым смесителем.
- Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно государственным нормам. Рекомендуется использование контрольных сывороток или плазмы, чтобы обеспечить проверку правильности относительного результатов. Использовать контроли и на нормальных и патологических уровнях.
- Периоды распределения и инкубации должны быть одинаковыми для всех лунок в том же анализе. При ручном проведении анализа использовать многоканальный дозатор.
- Как только анализ начат, все этапы должны быть завершены без прерывания. Используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники дозатора для каждого реагента.
- Не позволяйте реакционным лункам высыхать в течение процедуры анализа. Это может вызвать высокие фоновые помехи в лунках бланка и ошибочные результаты.
- Если Вы не готовы к следующему этапу, или если процедура анализа неожиданно прервана, просто оставьте лунки в промывочном буфере. Однако, не более чем на 5 минут.

**ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

1. **Подготовить образцы и разбавленный промывочный буфер** как описано выше.

2. **Определить требуемое количество** 8-луночных стрипов. Настоятельно рекомендуется анализировать каждый образец и контроль в дубле.

**Рекомендуемое размещение контролей:**

- 2 лунки (например, A1 и B1): для бланка субстрата (100 мкл разбавителя образца)
  - 2 лунки (например, A2 и B2): для отрицательного контроля (100 мкл)
  - 2 лунки (например, A3 и B3): для положительного контроля (100 мкл)
- Остальные лунки используются для образцов пациентов.
3. Закрепить в штативе желаемое количество микротитрационных стрипов и накрыть пленкой для планшета (поставляемой). Возвратить остальные стрипы в мешочек и хранить при 2-8°C.

4. **Раскапать по 100 мкл разбавителя образца, контролей и разбавленных образцов** в соответствующие лунки стрипов.

5. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **30 минут при 37°C**.

6. **Промывка:** Процедура промывки крайне важна и должна проводиться с осторожностью. Неправильная промывка может вызвать неточные результаты, такие как низкая точность и высокий фон. Промывать планшет вручную или используя автоматический планшет-вошер. При ручной промывке энергично встряхнуть жидкость, и добавить 300 мкл разбавленного промывочного буфера. Освободить лунки, встряхнув жидкость, чтобы удалить любые ее остатки. Повторить эту процедуру, чтобы в общем количестве составило 4 промывки. По завершении последней промывки перевернуть планшет и постучать о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки и прерывания.

При автоматической промывке произвести аспирацию всех лунок и промыть 4 раза **300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Опорожнить лунки, встряхнув жидкость, для удаления ее остатков. Повторить эту процедуру, что в общем количестве получилось **4 промывки**. После конечной промывки перевернуть планшет и постучать ним о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки или прерывания.

При автоматический промывке произведите аспирацию всех лунок и промойте 4 раза **300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Постучать планшетом о промокательную бумагу. Перейти к следующему этапу без задержки и прерывания.

7. Добавить последовательно по **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку.

8. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **30 минут при 37°C**.

9. **Промывка:** Промыть планшет следуя процедуре в этапе 6.

10. **Быстро раскапать по 50 мкл** раствора ТМБ в промытые лунки.

11. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение **15 минут при 37°C**.

12. Остановить реакцию, добавив 25 мкл стоп-раствора ТМБ в каждую лунку. Осторожно встряхнуть и считать при 450 нм в пределах **20 минут**

с момента добавления стоп-раствора.

**СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА**

<b>Разбавленный образец 100 мкл</b>	<b>Ферментный конъюгат 100 мкл</b>	<b>Субстрат ТМБ 50 мкл</b>	<b>Стоп-раствор ТМБ 25 мкл</b>
30 мин. Инкубации при 37°C.	30 мин.	15 мин.	Считать планшет

**ЗНАЧЕНИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА**

Перед началом расчета результатов убедитесь, что полученные значения для реагента бланка и контролей находятся в пределах предоставленных в Таблице 1 значений.

**Таблица 1:** Значения контроля качества

Образец	Ожидаемый результат
Бланк реагент	Значение абсорбции < 0.150
Отрицательный контроль	Значение абсорбции <0,200 *(Отриц. с соотнош. s/co <0,8
Положительный контроль	Положительный (соотнош. s/co ≥1)

\*s/co – абсорбция образца/пороговое значение

Результаты считаются достоверными только если значение абсорбции бланка не превышает 0,150 и значение средней абсорбции отрицательного контроля не превышает 0,200.

**РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

**1. Расчет ОП порогового значения (cut-off):**

$$\text{ОП Cut-off} = \text{константа Cut-off} \times (\text{ОП полож. константы} - \text{ОП отриц. константы})^*$$

Показатель константы порогового значения см. в Сертификате контроля качества, сопровождающий этот набор. Для точной интерпретации результатов обязательно использовать правильный показатель константы порогового значения.

**2. Расчет соотношения s/co:**

$$S/CO = \frac{\text{значение ОП образца}^* - \text{ОП отрицательного контроля}}{\text{ОП порогового значения}}$$

\*Настоятельно рекомендуется анализировать каждый контроль в дубле. Просьба использовать средние значения абсорбции каждого контроля/образца исходя их формул выше.

**3. Схема интерпретации результатов соотношения s/co:**

Соотношение s/co	Интерпретация
<0,80	Отрицательный
0,80-0,99	Сомнительный
≥1	Положительный

**4. Диагностическая достоверность результатов**

**Таблица 2:** Диагностическая достоверность и интерпретация результатов.

	Результаты IgM	Результаты IgM	Интерпретация
ЦМВ	Положительный или отрицательный	Положительный	Острая инфекция
	Положительный	Отрицательный	Прошедшая инфекция
	Отрицательный	Отрицательный	Антител не обнаружено

**5. Полуколичественный расчет результатов анализа**

Вы можете перевести значение ОП Вашего образца в ИФАЕ (иммуоферментные единицы) следующим образом:

$$\text{ИФАЕ} = S/CO \times 25$$

**6. Интерпретация образцов острой фазы болезни и выздоравливающих**

Для определения сероконверсии необходимо сравнить значения ОП парных образцов и рассчитать следующее:

$$\% \text{ изменения} = \frac{\text{значение ОП 2го образца} - \text{значение ОП 1го образца}}{\text{Значение ОП 1го образца}} \times 100$$

7. Схема интерпретации сероконверсионных результатов

% изменения в значении ОП	Интерпретация
< 50%	Отсутствие сероконверсии. Отсутствие очевидности недавней инфекции. Рекомендуется сделать забор третьего образца и анализировать параллельно с первым образцом, чтобы наблюдать за значительным увеличением показателя ОП.
≥ 50%	Сероконверсия. В показателе ОП обнаруживается значительное увеличение. Серологический признак острой инфекции (реактивация, повторная инфекция или первичная инфекция, где образец острой фазы был собран слишком поздно, чтобы продемонстрировать сероконверсию).

Значительное (т.е. ≥ 50%) увеличение абсорбции (ОП) в ИФА при 450 нм в парных сыворотках, собранных в промежутке 8-15 дней указывает на острую инфекцию.

**ПРИМЕР РАСЧЕТА**

Образец	Средняя абсорбция при 450 нм
Реагент бланка	0,050
Положительный контроль	1,378
Отрицательный контроль	0,068
Сыворотка образца	0,678

\*Пороговое значение ОП = 0,220\* (1,378-0,068) = 0,228  
 (Примечание: показатель константы порогового значения, указанный выше 0,220 является только примером. Правильное значение для настоящего набора см. в Сертификате контроля качества).  
 S/CO = 0,678 - 0,068 / 0,228 = 2,7  
 Значение ИФАЕ образца : 2,7 x 25 = 67 ИФАЕ  
 Результат образца: положительный  
 Значение ИФАЕ образца: 67 ИФАЕ

**РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА**

Всего 65 образцов пациентов использовалось для оценки специфичность, чувствительность и точность анализа. Результаты исследования настоящего набора были сравнены с результатами другого имеющегося в продаже набора ИФА:

CMV IgM		Reference EIA			
		N	E	P	Total
Orgerium EIA	N	26 (D)	0	3 (B)	29
	E	0	0	0	0
	P	0 (C)	0	26 (A)	26
	Total	26	0	29	55

N = отрицательный; E = сомнительный; P = положительный Total = всего Reference EIA = референтный ИФА

Чувствительность = A / (A+B) = 26/29 = 90%  
 Специфичность = D / (C+D) = 26/26 = 100%  
 Точность = (A+D) / (A+B+C+D) = 62/55 = 95%

ИФА ЦМВ	IgM
Точность в анализе	7 – 9 %
Точность между анализами	5 – 8 %
Точность между сериями	3 – 8 %
Перекрестная реактивность	Отсутствие перекрестной реактивности к ЦМВ с отрицательным IgG и гриппу А, В, парагриппу 1, T.gondii, краснухе и РСВ IgM положительным образцам.

Интерференции	Отсутствует относительно билирубина в концентрации до 0.3 мг/мл, гемоглобина до 8.0 мг/мл и триглицеридов до 5.0 мг/мл
*Серологическая специфичность	100 %
*Серологическая чувствительность	90 %

\*По сравнению с другим коммерчески доступным набором ИФА IgM ЦМВ.

**ВНИМАНИЕ**

- Отрицательный результат не исключает текущей или недавней инфекции. Если есть подозрение на острую инфекцию, второй образец сыворотки, полученный 7-14 днями позже, должен быть проверен параллельно, чтобы определить любое увеличение уровня антитела.
- Серологические результаты иммунодепрессивных пациентов должны интерпретироваться с предостережением.
- Результаты исследований, которые получены от единственного серологического образца, не должны использоваться для диагностики недавней инфекции. Соединенные образцы (острый и выздоравливающий) должны исследоваться параллельно, чтобы наблюдать за значительным повышением уровня антител.
- Если требуются сравнения с другими методами, всегда проводят оба исследования одновременно, чтобы предотвратить неожиданные результаты.
- Результаты исследований должны быть оценены в сочетании с информацией, предоставленной клиническим обследованием и другими диагностическими процедурами.
- На эффективность работы компонентов набора не влияет транспортировка при температуре окружающей среды до 5 дней (неофициальные данные).

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ОТВЕТСТВЕННОСТЬ**

Настоящий набор предназначен только для диагностического использования in vitro в человеческой сыворотке или плазме квалифицированным и компетентным персоналом, выполняющим диагностические процедуры. Если получатель настоящего набора передает его любым способом третьему лицу, эта инструкция, должна прилагаться, и вышеуказанный получатель должен под собственную ответственность обеспечить в пользу производителя все ограничения ответственности здесь изложенные. Компания-производитель не несет ответственности за любые повреждения или потери из-за использования набора в любых случаях кроме тех, которые четко указаны в этой инструкции. Ответственность производителя ни в коем случае не должна превышать коммерческой ценности набора. Производитель ни в коем случае не несет ответственности за косвенные, умышленные или наследственные повреждения, включая, но не ограничиваясь потерей прибыли.

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: info@diameb.ua  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)